

荧光免疫层析法结合免疫磁珠分离技术快速检测单增李斯特菌

张赛^{1,2}, 何小维¹, 刘晓云^{2,3}, 彭运平², 李文美^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 广州万孚生物技术股份有限公司自检型快速诊断国家地方联合工程实验室, 广东广州 510663)

(3. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院, 广东广州 510515)

摘要: 为建立单增李斯特菌简单快速、灵敏度高和特异性强的检测方法, 本研究以抗单增李斯特菌单克隆抗体偶联磁珠制备免疫磁珠; 以羧基荧光微球标记的抗单增李斯特菌多克隆抗体及鼠 IgG 为标记抗体, 抗单增李斯特菌多克隆抗体和羊抗鼠二抗分别作为检测线和质控线制备荧光免疫层析试纸条。将免疫磁珠分离与荧光免疫层析法相结合应用于单增李斯特菌的现场快速检测中。结果表明: 荧光免疫层析试纸条对纯培养单增李斯特菌的检测限为 4×10^5 CFU/mL, 联合检测方法 10 倍、100 倍浓缩时, 检测限分别为 4×10^4 CFU/mL 和 1×10^4 CFU/mL。联合检测体系特异性较好, 与实验室保存的 10 株细菌无交叉反应。人工污染样本检测限为 1×10^4 CFU/mL, 同纯培养物相比检测灵敏度并没有降低。本方法的建立对于食品中单增李斯特菌的现场快速检测具有重要意义。

关键词: 单增李斯特菌; 抗体; 免疫磁珠; 荧光免疫层析; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2014)11-229-234

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.040

Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* Using a Fluorescence Immunochromatographic Assay Combined with Immunomagnetic Bead Separation

ZHANG Sai^{1,2}, HE Xiao-wei¹, LIU Xiao-yun^{2,3}, PENG Yun-ping², LI Wen-mei^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. National & Local United Engineering Lab of Rapid Diagnostic Test, Wondfo Biotech Co., Ltd., Guangzhou 510663, China) (3. School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: In order to establish a simple, rapid, sensitive, and specific method to detect *Listeria monocytogenes*, in this study, immunomagnetic beads were prepared by coupling anti-*L. monocytogenes* monoclonal antibody with magnetic beads. The fluorescence immunochromatographic strips were composed of anti-*L. monocytogenes* polyclonal antibody and mouse IgG marked by fluorescent microspheres as the detection antibody, anti-*L. monocytogenes* polyclonal antibody as the test line, and the goat anti-mouse IgG secondary antibody as the control line. Immunomagnetic separation was combined with a fluorescence immunochromatographic assay, and this method was applied to rapidly detect *L. monocytogenes*. The results showed that the detection limit of fluorescence immunochromatographic strips for pure cultures was 4×10^5 CFU/mL. For the joint detection method using samples concentrated 10- and 100-fold, the detection limits of pure culture samples were 4×10^4 CFU/mL and 1×10^4 CFU/mL, respectively. The joint detection method showed good specificity, and no cross-reactivity of the 10 strains kept in the laboratory was observed. The detection limit of artificially contaminated samples was also 1×10^4 CFU/mL and was not reduced compared with pure cultures. This method is of great value for rapid on-site detection of *L. monocytogenes* in food products.

Key words: *Listeria monocytogenes*; antibody; immunomagnetic beads; fluorescence immunochromatography; rapid detection

收稿日期: 2014-05-08

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAK08B07); 国家发改委创新平台建设资助项目 (发改高技[2011]2041号)

作者简介: 张赛 (1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 何小维 (1959-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 功能碳水化合物材料理论与技术

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 为革兰氏阳性杆菌, 属于李斯特属。李斯特菌属中单核细胞增生李斯特菌是人畜共患病的病原菌, 绵羊李斯特菌是动物致病菌, 其余无致病性。被该菌感染后会出现发烧、脑膜炎、败血症、单细胞增多等症状, 尤以妊娠期妇女、新生儿以及免疫功能低下的病人更易感染。在主要的食源性致病菌种, 单增李斯特菌感染引起的死亡率最高, 致死率达 20%~40%。该菌在 4 °C 的环境中仍可生长繁殖, 是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一^[1-3]。因此建立敏感性高、特异性强、简便快速的单增李斯特菌检测技术已成为众多研究者的共同期望。

传统的分离培养法费时费力, 不满足当前致病菌敏感、快速检测的需要。分子生物学方法, 例如核酸探针法、荧光定量 PCR 法、基因芯片法等检测灵敏度高, 但所需仪器设备昂贵, 且对操作技术要求高^[4-5]。各种类型的免疫学检测方法, 如酶联免疫吸附法^[6]、胶体金免疫层析法^[7-8]、免疫磁性分离法^[9]等已被广泛用于致病菌及毒素的检测。在所有的免疫学方法中, 免疫层析法是最简单快速的手段, 它可以在 15 min 内检测出样本中致病菌的存在。胶体金是最常用的免疫层析标记物, 能物理吸附抗体蛋白, Shim^[7]等利用胶体金免疫层析法检测食品样本中单增李斯特菌, 检测限为 10⁵ CFU/mL。Fisher 等^[10]利用免疫磁珠联合胶体金免疫层析技术检测炭疽芽胞杆菌, 单独用胶体金免疫层析灵敏度为 3×10⁷ CFU/mL, 100 倍浓缩后检测灵敏度提高了 60 倍。荧光微球表面修饰的羧基、氨基可共价结合抗体, 荧光信号强而稳定, 易于量化, 这些优势使其成为一种新型的标记物。解泉源等^[11]利用荧光微球为标记物, 建立了快速、灵敏检测大肠杆菌 O157:H7 的荧光微球免疫层析法, 检测限达到 6.1×10³ CFU/mL。

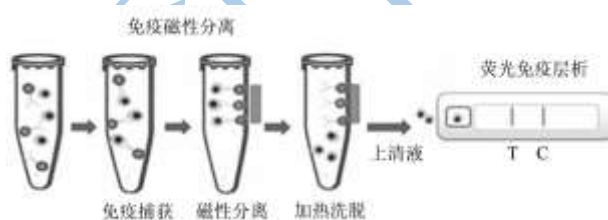


图 1 免疫磁珠分离结合荧光免疫层析方法检测过程示意图

Fig.1 Schematic diagram of immunomagnetic separation combined with a fluorescence immunochromatographic assay

本研究将荧光免疫层析技术 (Fluorescence Immunochromatographic Assay, FICA) 与免疫磁性分离技术 (immunomagnetic separation, IMS) 相结合, 首先利用免疫磁珠特异地从食品基质中分离并富集目

标菌, 然后加入到荧光免疫层析试纸条上进行检测, 该方法消除了食品基质和杂菌的干扰, 将待检样本富集浓缩, 可大大提高检测的灵敏度和准确度, 具有经济、简便、快速等特点。图 1 为检测过程的示意图。免疫磁珠分离技术结合荧光免疫层析检测单增李斯特菌的方法目前尚未见报道, 本方法的建立对于单增李斯特菌的现场筛查与防控具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株与抗体

本实验所用菌株, 单核细胞增生李斯特菌 ATCC 19115 (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115)、单核细胞增生李斯特菌 CMCC 54002 (*Listeria monocytogenes* CMCC 54002)、单核细胞增生李斯特菌 CMCC 54003 (*Listeria monocytogenes* CMCC 54003)、单核细胞增生李斯特菌 CMCC 54004 (*Listeria monocytogenes* CMCC 54004)、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028)、甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093 (*Salmonella paratyphi* ACMCC 50093)、乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50094 (*Salmonella paratyphi* BCMCC 50094)、伤寒沙门氏菌 CMCC 50071 (*Salmonella typhi* CMCC 50071)、大肠埃希氏菌 O157:H7 NCTC 12900 (*Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900)、普通大肠埃希氏菌 CMCC 44108 (*Escherichia coli* CMCC 44108)、副溶血弧菌 ATCC 33847 (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33847)、副溶血弧菌 ATCC 17802 (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)、苏云金芽孢杆菌 ATCC 10792 (*Bacillus thuringiensis* ATCC 10792)、八叠球菌 CMCC 28001 (*Sarcina* CMCC 28001) 均为本实验室保存; 鼠抗单增李斯特菌单克隆抗体, 台湾 Abnova 公司; 兔抗单增李斯特菌多克隆抗体、鼠 IgG 及羊抗鼠 IgG 均为本实验室制备。

1.2 试剂与仪器

羧基磁珠 xMag, 西安金磁纳米生物技术有限公司; 碳二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS), 美国 Thermo Scientific 公司; 荧光胶乳, 美国 Bangs lab 公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、吐温-20、一水吗啉乙磺酸 (MES), 美国 Sigma 公司; 硼砂、硼酸、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠, 广州化学试剂厂。其余试剂均为国产分析纯。

LSKMAGS08 磁性分离架, 德国 Merck 公司; MS-12 多功能磁性分离器, 上海奥润微纳科技有限公

司; HS-3 旋转混合器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; ND2000 型超微量分光光度计、Legen RT+ 台式高速冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; IsoFlow 型喷膜机, 美国 Biodot 公司; HGS201 切条机, 杭州峰航科技有限公司; TECNAL-10 型透射电镜, 荷兰 PHILIPS 公司; 2HWY21029 型恒温培养振荡器, 上海智诚分析仪器制造; SW-CJ-1FD 无菌洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; Milli-Q 超纯水机, 美国 Millipore 公司; 飞测 II 荧光定量检测仪, 广州万孚生物技术股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫磁珠的制备及优化

1.3.1.1 免疫磁珠的制备

取 1 mg 羧基磁珠到 1.5 mL 离心管中, 用 500 μ L MEST 缓冲液 (10 mM, pH 6.0, 0.05% Tween-20) 洗涤两次, 磁性分离后移除上清; 加入 MES 缓冲液现配的 EDC 和 Sulfo-NHS 溶液 (5 mg/mL) 各 0.2 mL, 37 $^{\circ}$ C 活化 30 min, 期间用旋转混合器保持磁珠处于悬浮状态; 磁性分离后移除上清, 加入 500 μ L MEST 缓冲液, 将磁珠转移到新的离心管中, 再次磁性分离, 用 500 μ L MEST 缓冲液洗涤两次, 磁性分离, 移除上清。向磁珠中加入一定量的抗体, 用 MES 缓冲液调节总体积至 500 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下偶联 2 h, 期间保持磁珠处于悬浮状态。磁性分离, 移除上清, 加入硼酸盐缓冲液 (0.04 M, pH 8.0, 0.05% Tween-20, 1% BSA) 重悬, 37 $^{\circ}$ C 封闭 45 min, 可置于恒温振荡器中, 保持磁珠处于悬浮状态。磁性分离, 移除上清, 用 500 μ L MEST 缓冲液洗涤四次, 磁性分离, 移除上清, 用硼酸盐缓冲液 (0.04 M, pH 8.0, 0.05% Tween-20, 0.1% BSA, 0.02% NaN_3) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.1.2 免疫磁珠工作浓度的确定

同时取 1 mL 平板计数的 10^5 CFU/mL 的菌液到五个 1.5 mL 离心管中, 分别加入 80 μ g/mg 单克隆抗体/磁珠偶联比制备的免疫磁珠 0.05、0.1、0.15、0.25 和 0.5 mg, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 磁性分离, 取上清 50 μ L 涂布于 PALCAM 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 记录菌落数。每个样品设置三个平行, 同时以偶联 BSA 的空白磁珠为阴性对照。磁珠捕获效率 (capture efficiency, CE) 按照公式 (1) 计算^[12], 式中 C_0 为捕菌前的菌落数, C_u 为捕菌后上清液中的菌落数。

$$CE(\%) = (1 - \frac{C_u}{C_0}) \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 荧光免疫层析试纸条的制备及优化

1.3.2.1 荧光免疫层析试纸条的制备

本研究采用液相荧光免疫层析的方法制备试纸条^[13], 以羧基荧光微球标记的抗单增李斯特菌多克隆抗体和鼠 IgG 为标记抗体, 测试时将荧光胶乳标记的抗体与待测样本按一定比例混匀反应 1 min, 形成免疫复合物, 然后取 75 μ L 滴加于免疫层析试纸条的加样孔, 然后用荧光定量检测仪检测。试纸条的组装是在聚氯乙烯 (PVC) 板上顺次相互搭接样品垫、硝酸纤维素包被膜和吸水纸, 然后用切条机切割成 4 mm 宽的试纸条。包被膜上用喷膜机喷一定浓度的抗单增李斯特菌多克隆抗体和羊抗鼠二抗分别作为检测线 (T 线) 和质控线 (C 线)。试纸条组成如图 2 所示。



图 2 试纸条组成

Fig.2 Test strip compositions

1.3.2.2 荧光胶乳标记抗体浓度的确定

荧光胶乳的标记过程参照本实验室已建立的方法^[14]。将荧光胶乳标记的 LM 抗体和鼠 IgG 用胶乳稀释液按 1:200 和 1:1000 比例稀释, 取 1×10^8 CFU/mL 的 LM 菌液与荧光液按 1:1 比例混合加样, 反应时间 15 min 的条件下, 研究每毫升荧光胶乳加入 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mg 的 LM 抗体对荧光信号 T/C 值的影响, 以确定最佳抗体标记浓度。

1.3.3 免疫磁珠分离结合荧光免疫层析检测方法的建立

1.3.3.1 FICA 及 IMS-FICA 检测方法灵敏度分析

分别取浓度为 1×10^6 、 4×10^5 、 2×10^5 、 1×10^5 、 4×10^4 、 2×10^4 、 1×10^4 和 4×10^3 CFU/mL 的菌液 1 mL、10 mL 各置于 1.5 mL 和 15 mL 的离心管中, 每只离心管加入 0.25 mg 免疫磁珠, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 40 min, 磁性分离后除去上清, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 磁性分离后向各离心管中加入 100 μ L PBS 缓冲液, 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 磁性分离, 吸取上清后与荧光胶乳按 2:1 比例混合反应 1 min, 取 75 μ L 滴加于免疫层析试纸条加样孔。另取不同浓度的菌液直接滴加于荧光免疫层析试纸条进行检测。以空白缓冲液作阴性对照, 比较单独用荧光免疫层析试纸条、联合检测方法 10 倍浓缩和 100 倍浓缩下的检测灵敏度。每个浓度重复 6 次, 用免疫荧光检测仪扫描读取空白样品 T/C 比值, 空白样品 T/C 比值的平均值与 3 倍标准差之和为 CUT-OFF 值, 样品测试值大于判定值为阳性。

1.3.3.2 IMS-FICA 检测方法特异性分析

分别取 1 mL 10^5 CFU/mL 的 4 株不同血清型的单

增李斯特菌和 10 株非单增李斯特菌菌株于 1.5 mL 离心管中, 每只离心管加入 0.25 mg 免疫磁珠, 37 °C 振荡孵育 40 min, 磁性分离后除去上清, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 磁性分离后向各离心管中加入 100 μ L PBS 缓冲液, 70 °C 孵育 10 min, 磁性分离, 吸取上清后与荧光胶乳按 2:1 比例混合反应 1 min, 取 75 μ L 滴加于免疫层析试纸条加样孔。比较不同菌种的荧光免疫层析检测信号 (T/C 值), 以空白稀释液作阴性对照, 每个浓度重复 3 次。

1.3.3.3 人工污染样本检测

取用 PBS 缓冲液 10 倍稀释的火腿肠、猪肉、牛奶均质稀释液 9 mL, 分别加入 1 mL 1×10^5 、 2×10^5 和 1×10^6 CFU/mL 的 LM 菌悬液, 使其终浓度分别为 1×10^4 、 2×10^4 和 1×10^5 CFU/mL。检测步骤同 1.3.3.2, 最后比较不同菌液浓度下不同食品样本的荧光免疫层析检测信号 (T/C 值), 以空白均质稀释液作阴性对照, 每个浓度重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 免疫磁珠工作浓度的确定

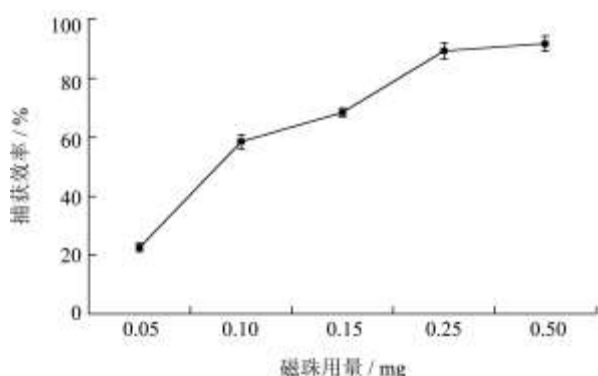


图 3 免疫磁珠不同添加量对捕获效率的影响

Fig.3 Effect of various immunomagnetic bead concentrations on capture efficiency

图 3 为不同免疫磁珠添加量条件下磁珠的捕获效率, 从图中可以看出, 在磁珠用量为 0.05~0.25 mg 时, 随着磁珠用量的增加, 免疫磁珠的捕获效率逐渐增大; 当磁珠用量大于 0.25 mg 时, 磁珠的捕获效率趋于稳定, 说明磁珠捕获菌体的能力趋向饱和。考虑到经济效益, 确定捕获 1 mL 10^5 CFU/mL 菌液所需添加免疫磁珠的量为 0.25 mg。

2.2 荧光胶乳微球透射电镜图谱

图 4a 为原荧光胶乳透射电镜图, 从图中可以看出实验所用胶乳微球呈均一分散的球形, 粒径为 400

nm 左右。图 4b 为与抗体蛋白共价偶联后的免疫胶乳透射电镜图, 从图中可以看出胶乳-抗体复合物仍均一分散, 没有出现团聚和聚沉现象。

2.3 抗体标记浓度的选择

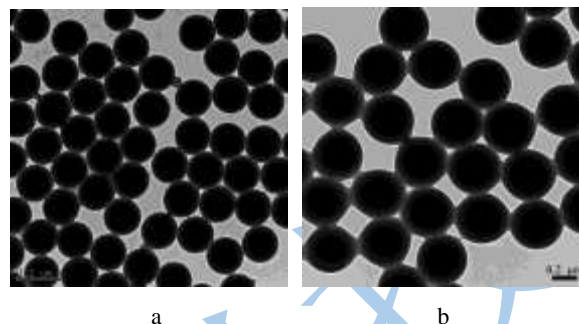


图 4 荧光胶乳微球透射电镜图

Fig.4 Transmission electron microscope images of fluorescent latex microspheres

注: a: 原荧光胶乳, b: 免疫荧光胶乳。

不同标记抗体浓度下免疫层析试纸条荧光信号如图 5 所示, 在 0.1~0.6 mg/mL 的范围内, 随着抗体浓度的增加, 荧光信号值逐渐增加, 高于 0.6 mg/mL 时, 荧光信号值变化平稳, 说明抗体标记浓度为 0.6 mg/mL 时, 荧光胶乳微球偶联蛋白量已达到饱和, 因此我们选择 0.6 mg/mL 为最佳抗体标记浓度。

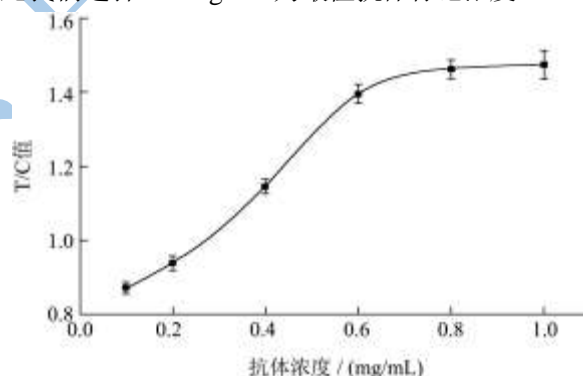


图 5 试纸条 T/C 值随标记抗体浓度的变化

Fig.5 T/C value of test strips with various amounts of labeling antibody

2.4 FICA 及 IMS-FICA 检测方法灵敏度分析

荧光免疫层析及免疫磁珠联合荧光免疫层析检测灵敏度结果见表 1, 荧光免疫层析试纸条的检测限为 4×10^5 CFU/mL; 加上免疫磁珠富集, 纯培养样品 10 倍浓缩时, 最低检测浓度为 4×10^4 CFU/mL, 灵敏度提高了 10 倍; 纯培养样品 100 倍浓缩时, 最低检测浓度为 1×10^4 CFU/mL, 检测灵敏度至少提高了 40 倍。由此可见, 免疫磁珠联合荧光免疫层析检测方法, 可显

著提高检测的灵敏度。

表 1 FICA 及 IMS-FICA 检测体系灵敏度分析

Table 1 Sensitivity analysis of FICA and IMS-FICA

菌液浓度/(CFU/mL) n=6	FICA	IMS-FICA	
		10 倍浓缩	100 倍浓缩
1×10 ⁶	+	+	+
4×10 ⁵	+	+	+
2×10 ⁵	-	+	+
1×10 ⁵	-	+	+
4×10 ⁴	-	+	+
2×10 ⁴	-	-	+
1×10 ⁴	-	-	+
4×10 ³	-	-	-

注：“+”表示荧光检测信号高于CUT-OFF值，即阳性；“-”表示荧光检测信号低于CUT-OFF值，即阴性。

2.5 IMS-FICA 联合检测方法特异性分析

免疫磁珠与荧光免疫层析联合检测特异性分析如图 6 所示，单增李斯特菌种内 4 种常见血清型均有较强烈的反应，与其它菌属的 10 种菌均没有交叉反应，这说明联合检测方法的特异性较好。

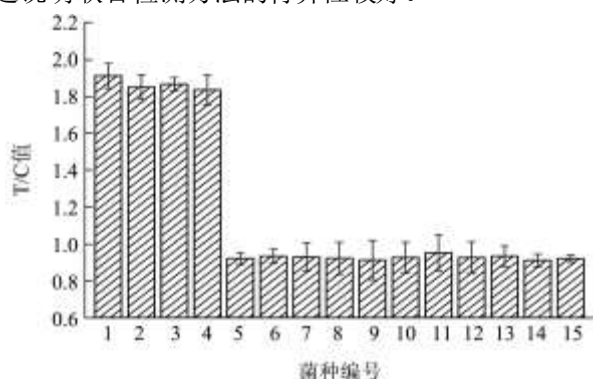


图 6 IMS-FICA 检测体系特异性分析

Fig.6 Specificity analysis of IMS-FICA

Note: 1: LM 4b, 2: LM 1/2c, 3: LM 1/2a, 4: LM 1/2b, 5: Sarcina, 6: Bacillus thuringiensis, 7: Vibrio parahaemolyticus ATCC 33847, 8: Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802, 9: Salmonella typhimurium, 10: Salmonella paratyphi B, 11: Salmonella paratyphi A, 12: Salmonella typhi, 13: Escherichia coli O157:H7, 14: Escherichia coli, 15: blank.

2.6 人工污染样本检测

联合检测方法人工污染样本检测结果如图 7 所示，从图中荧光检测信号 T/C 值可以看出不同食品基质中免疫磁珠捕菌情况有所不同，说明不同食品基质对免疫磁珠捕菌效率也有影响。对于火腿肠、猪肉和牛奶三种固体和液体食品样本，人工污染样品 100 倍

浓缩时最低检测浓度为 1×10⁴ CFU/mL，同纯培养物相比检测灵敏度并没有降低。

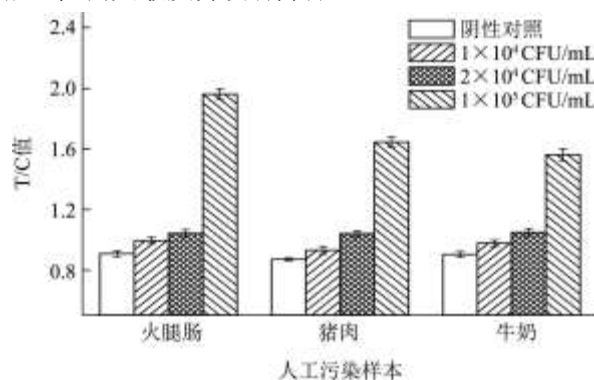


图 7 人工污染样本检测

Fig.7 Detection of artificial contamination in samples

3 结论

3.1 本研究利用免疫学的原理，结合免疫标记技术和免疫层析方法，以荧光胶乳微球作为示踪物，并利用免疫荧光检测仪检测荧光信号，操作简单快速，不需要专业人员。在样品的处理过程通过自制特异性强、敏感性高的免疫磁珠捕获样品中的致病微生物，采用免疫磁珠富集后的菌液上样，可以避免不同食品基质对免疫层析检测的干扰，提高检测结果的灵敏度和准确性。

3.2 本研究确定捕获 1 mL 10⁵ CFU/mL 菌液所需添加免疫磁珠的量为 0.25 mg，荧光胶乳微球标记抗体的最佳浓度为 0.6 mg/mL。荧光免疫层析试纸条对纯培养单增李斯特菌的检测限为 4×10⁵ CFU/mL，联合检测方法 10 倍、100 倍浓缩时，检测限分别为 4×10⁴ CFU/mL 和 1×10⁴ CFU/mL。联合检测体系特异性较好，与实验室保存的 10 株细菌无交叉反应。人工污染样本检测限为 1×10⁴ CFU/mL，同纯培养物相比检测灵敏度并没有降低。本检测体系的建立为单增李斯特菌的检测提供一种新的模式，同时也为我国食品安全事业做出一定的贡献，本研究的实施能带来一定的经济利益和社会效益，具有重要的意义。

参考文献

[1] Drevets DA, Bronze MS. Listeria monocytogenes: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion [J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008, 53(2): 151-165

[2] Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(3): 584-640

[3] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, et al. Surface proteins

- and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* [J]. Trends in microbiology, 2002, 10(5): 238-245
- [4] Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(5): 851-875
- [5] Mandal P, Biswas A, Choi K, et al. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview [J]. Am. J. Food Technol., 2011, 6(2): 87-102
- [6] Kim SH, Park MK, Kim JY, et al. Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies [J]. Journal of Veterinary Science, 2005, 6(1): 41-46
- [7] Shim WB, Choi JG, Kim JY, et al. Production of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and its application to immunochromatography strip test [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(7): 1152-1161
- [8] Kim SH, Kim JY, Han W, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic assay for screening *Listeria* spp. in pork and milk [J]. Food Science and Biotechnology, 2007, 16(4): 515-519
- [9] Shim WB, Choi JG, Kim JY, et al. Enhanced rapidity for qualitative detection of *Listeria monocytogenes* using an enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatography strip test combined with immunomagnetic bead separation [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(4): 781-789
- [10] Fisher M, Atiya-Nasagi Y, Simon I, et al. A combined immunomagnetic separation and lateral flow method for a sensitive on-site detection of *Bacillus anthracis* spores-assessment in water and dairy products [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(4): 413-418
- [11] 解泉源, 赖卫华, 刘春梅, 等. 大肠杆菌 O157:H7 荧光微球免疫层析试纸条的研制[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 353-357
XIE Quan-yuan, LAI Wei-hua, LIU Chun-mei, et al. Development of fluorescent microsphere immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Journal of Food Science, 2013, 16(34): 353-357
- [12] Varshney M, Yang L, Su X L, et al. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(9): 1804-1811
- [13] 郭诗静, 唐海波, 齐维. 免疫荧光层析法快速检测猪尿中克伦特罗含量[J]. 现代食品科技, 2013, 29(5): 1154-1156
GUO Shi-jing, TANG Hai-bo, QI Wei. Rapid detection of Clenbuterol content in pig urine by immunofluorescence chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1154-1156
- [14] 王红. 人降钙素原单克隆抗体的制备及其应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012
WANG Hong. Preparation and application of monoclonal antibody against human procalcitonin [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012